

Kwantificatie van T-celinfiltiraat met digitale PCR

R.J. Nell

Leids Universitair Medisch Centrum
r.j.nell@lumc.nl

M.J. de Lange (begeleider)

Leids Universitair Medisch Centrum
m.j.de_lange@lumc.nl

ABSTRACT

In een kwantitatieve tumorbeschrijving wordt de aanwezigheid van specifieke cellen uitgedrukt in percentages. Deze waarden kunnen het onderzoek naar het ontstaan en beloop van de kanker ondersteunen, en mogelijk worden gecorreleerd aan bepaalde prognostische of therapeutische uitkomsten. Met dit onderzoek introduceren wij een nieuwe en unieke methode om op relatief eenvoudige wijze accuraat het T-celinfiltiraat in kankersamples en ander weefsel te kwantificeren. Hierbij wordt geïsoleerd DNA geanalyseerd middels digitale PCR. In klasse IIB-oogmelanomen kan met deze methode een uitgebreid T-celinfiltiraat worden aangetoond.

Sleutelwoorden

TIL's (tumorinfiltrerende lymfocyten), T-cellen, ddPCR, kwantitatieve tumorbeschrijving, oogmelanoom

INTRODUCTIE

Hoewel kankergezwellen gezien kunnen worden als een homogene massa van kwaadaardige cellen, is het belangrijk te realiseren dat deze gezwellen niet volledig uit kankercellen bestaan. Zo zijn er onder andere ook (gezonde) bloedcellen aanwezig, die bijvoorbeeld voorzien in de zuurstoftoevoer naar de kankercellen.

Recente technologische ontwikkelingen hebben het mogelijk gemaakt tumoren op accurate wijze kwantitatief te beschrijven. [1] Hiermee wordt bedoeld dat aan het voorkomen van bepaalde cellen in tumormassa's een percentage verbonden kan worden. Deze waarden kunnen vervolgens gebruikt worden in het onderzoek naar het ontstaan en beloop van de kanker. Ook kunnen deze percentages mogelijk worden gekoppeld aan bepaalde prognostische of therapeutische uitkomsten.

In dit onderzoek hebben wij ons gericht op T-lymfocyten, een bepaald type afweercellen dat bij kanker een belangrijke rol kan spelen. Ook deze cellen kunnen in kankergezwellen aanwezig zijn; men spreekt dan van 'tumorinfiltrerende lymfocyten' (TIL's).

Met ons onderzoek introduceren wij een nieuwe en unieke methode om op relatief eenvoudige wijze accuraat het T-celinfiltiraat in monsters uit kankers te kwantificeren. Daarmee kunnen we antwoord geven op de vraag 'Hoeveel procent van de cellen in het kankergezwel is T-cel?'. Hoewel wij dit in eerste instantie specifiek wilden weten voor een bepaalde vorm van kanker in het oog, is de gebruikte methode veel breder toepasbaar. Zo kunnen naast andere tumortypes ook andere weefsels gemakkelijk worden onderzocht op de mate waarin T-cellen aanwezig zijn.

METHODE

De door ons ontwikkelde methode voorziet in een kwantitatieve benadering van T-celaanwezigheid middels digitale PCR. Deze methode is gebaseerd op een unieke T-celmarker gelegen in het DNA, die ontstaat door herschikkingen in het T-celreceptorgen bèta.

Herschikkingen in het TRB-gen

T-cellen beschikken op hun celoppervlak over receptoren die een rol spelen in het herkennen van antigenen en daarmee het opsporen en aanpakken van ziekteverwekkers.

Tijdens de ontwikkeling van T-cellen herschikken de genen die verantwoordelijk zijn voor deze T-celreceptoren. Dit is een volledig natuurlijk proces en houdt in dat bepaalde delen van het DNA met elkaar worden verbonden, en andere delen verloren gaan. Omdat dit herschikken per T-cel leidt tot een andere volgorde van het DNA (en dus steeds een andere blauwdruk voor de T-celreceptor), wordt hiermee een grote verscheidenheid aan receptoren gegenereerd. Dit zorgt voor diversiteit van het afweersysteem: verschillende receptoren herkennen verschillende antigenen en zo kunnen verschillende ziekteverwekkers worden opgespoord. De herschikkingen zijn om deze reden cruciaal in het vormen van een functioneel afweersysteem.

Omdat herschikkingen nodig zijn om vanuit het oorspronkelijke T-celreceptorgen een functionele receptor te kunnen vormen, moeten ze in iedere T-cel plaats hebben gevonden. In onze methode maken we hiervan gebruik: de herschikkingen zijn karakteristiek voor T-cellen en kunnen zo als T-celmarker worden gebruikt.

Het T-celreceptorgen bèta (TRB) codeert voor de bèta-keten van de T-celreceptor. Hoewel herschikkingen voor een groot deel willekeurig verlopen, is er een mate van systematiek waarin de herschikkingen plaatsvinden. In **Figuur 1** is schematisch weergegeven hoe het TRB-gen herschikt kan worden. [2]

$\Delta 1$, het stukje DNA dat bij dergelijke herschikkingen altijd verloren gaat, is daardoor specifiek in T-cellen niet meer aanwezig. In alle andere cellen is het TRB-gen niet herschikt, en is $\Delta 1$ dus nog wel aanwezig. We kunnen zeggen dat verlies van $\Delta 1$ daarmee een zeer goede marker is voor het identificeren van T-cellen op DNA-niveau.

ddPCR

Met de introductie van digitale PCR is het zeer goed mogelijk geworden accurate kwantificatie in DNA-samples te bereiken. [3] Wij maken hiervoor gebruik van het droplet digital PCR-systeem ('ddPCR', Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Figuur 1 - Overzicht herschikkingmogelijkheden TRB-gen.

Herschikkingen van het TRB-gen verlopen volgens een bepaalde systematiek. Er kunnen drie vormen van herschikking plaatsvinden, die hieronder worden beschreven.

Het TRB-gen bestaat uit verschillende segmenten. De opbouw van het TRB-gen (in normale, nog niet herschikte configuratie) is hieronder schematisch weergegeven:



Mogelijkheid 1

De herschikking van het TRB-gen kan starten bij het D1-segment, dat vervolgens verbonden wordt met één van de zes J1-segmenten:



Alle tussenliggende segmenten gaan hierbij verloren, maar de rest van het TRB-gen blijft intact. Hierna wordt één van de V-segmenten gekozen en verbonden met het DIJ1-gedeelte.



Mogelijkheid 2

De herschikking van het TRB-gen kan eveneens starten bij het D1-segment, maar vervolgens worden verbonden met één van de zeven J2-segmenten:



Alle tussenliggende segmenten gaan hierbij verloren, maar de rest van het TRB-gen blijft intact. Hierna wordt één van de V-segmenten gekozen en verbonden met het DIJ2-gedeelte:



Mogelijkheid 3

De herschikking van het TRB-gen kan ook starten bij het D2-segment, dat vervolgens verbonden wordt met één van de zeven J2-segmenten:



Alle tussenliggende segmenten gaan hierbij verloren, maar de rest van het TRB-gen blijft in eerste instantie intact:



Hierna wordt één van de V-segmenten gekozen en verbonden met het D2J2-gedeelte. Hierdoor gaan de segmenten D1 t/m C1 toch nog verloren:



Conclusie

Bij alle drie de herschikkingmogelijkheden verdwijnt uiteindelijk het **Δ1-gebied**. Dit gebied is het stukje niet-coderende DNA direct na segment D1. Doordat dit bij elke herschikking verdwijnt, kan het gebruikt worden als DNA-marker van T-cellen.

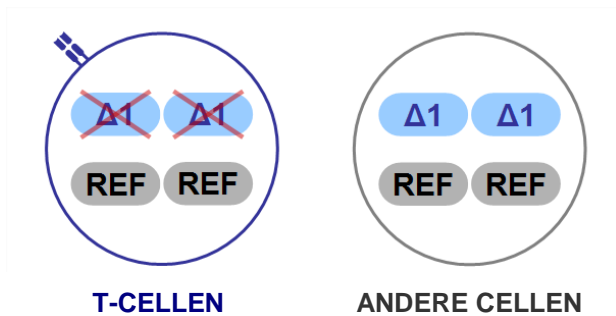
Met digitale PCR kan de aanwezigheid van geselecteerde stukjes DNA ten opzichte van elkaar nauwkeurig op eenvoudige wijze gemeten worden. DNA uit te onderzoeken weefsel moet hiervoor geïsoleerd worden, waarvoor wij de QIAmp DNA minikit (Qiagen, Valencia, USA) hebben gebruikt.

Vervolgens kan met het ddPCR-systeem een specifieke marker (de 'target') worden afgezet tegen een goed gekozen, stabiele chromosomale referentie.

Wiskundige benadering

Met de $\Delta 1$ hebben we een DNA-marker in handen waarmee middels digitale PCR de aanwezigheid van T-cellen kan worden gekwantificeerd. Hierbij wordt het model uit **Figuur 2** aangehouden.

Met digitale PCR kunnen we de verhouding $[\Delta 1]/[\text{REF}]$ in een sample berekenen. Dit is de verhouding tussen de hoeveelheid aanwezige $\Delta 1$ en de hoeveelheid aanwezige referentie.

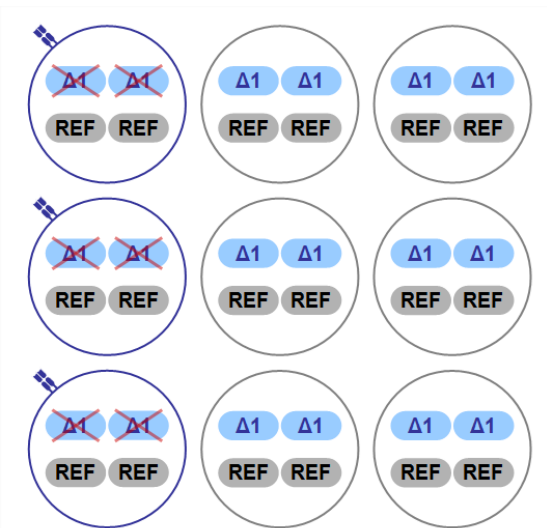


Figuur 2 - Alle cellen (inclusief de T-cellen) beschikken over twee kopieën van een stabiele referentie. De T-cellen worden echter gekarakteriseerd door het volledige verlies van $\Delta 1$, dat in alle andere cellen wel twee maal aanwezig is.

Omdat iedere cel twee kopieën van deze referentie bevat is het mogelijk uit de verhouding $[\Delta 1]/[REF]$ het percentage T-cellen in de sample te berekenen. Hierbij wordt de volgende formule gebruikt:

$$\text{T-celfractie} = 1 - \frac{[\Delta 1]}{[REF]}$$

In **Figuur 3** hieronder wordt aan de hand van een schematisch voorbeeld het gebruik van deze formule geïllustreerd:



Figuur 3 - In dit voorbeeld zijn 9 verschillende cellen weergegeven. De verhouding $[\Delta 1]/[REF]$ bedraagt 12/18, target $\Delta 1$ is immers 12 maal aanwezig en de referentie REF 18 maal. Wanneer met onze methode in dit sample de T-celfractie bepaald zou worden, dan zou dit de volgende berekening opleveren:

$$\text{T-celfractie} = 1 - \frac{[\Delta 1]}{[REF]} = 1 - \frac{12}{18} = 33,3\%$$

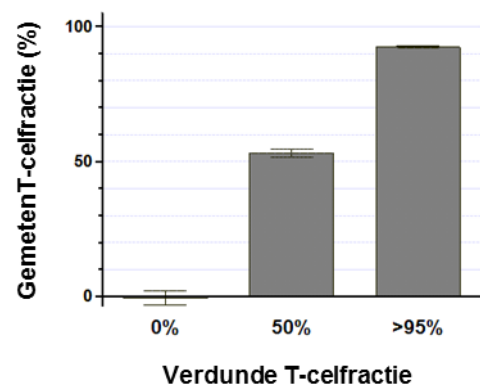
...wat een correcte T-celfractie van 33,3% oplevert: 1 op de 3 cellen in deze sample is een T-cel.

RESULTATEN

Onze methode is toepasbaar op verschillende typen (tumor)weefsel, inclusief bloedproducten.

Validatie methode

Om de methode te valideren hebben wij metingen uitgevoerd op T-cel-verrijkte bloedfracties en verdunningen daarvan. Bij een T-celfractie van 0%, 50% en >95% wordt met onze methode een adequate benadering van deze fractie gegenereerd, zoals is weergegeven in **Figuur 4**.



Figuur 4 - T-celfracties zoals gemeten met ddPCR in verdunningen van T-cellen.

Resultaten in oogmelanoom

Hoewel onze methode dus toepasbaar is op verschillende typen weefsel, was deze initieel bedoeld om bij te dragen aan een kwantitatieve tumorbeschrijving bij oogmelanomen. Oogmelanoom is een vrij zeldzame vorm van kanker die helaas nog steeds in veel gevallen een uiterst slechte prognose kent. Kwantificatie van celtypen binnen deze tumoren draagt sterk bij aan het onderzoek naar oogmelanoom. [1]

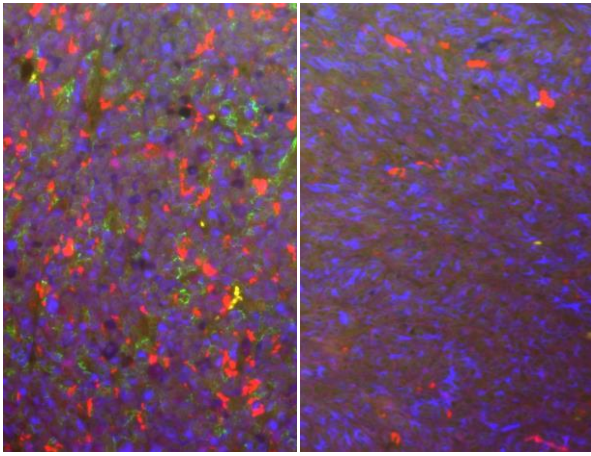
Coupekleuringen en fractiebepalingen

In **Figuur 5** worden twee coupekleuringen getoond waarin ook de fractie kankercellen (gemeten door De Lange et al. [1]) en de fractie T-cellen is bepaald. Deze coupekleuringen zijn tot stand gekomen in samenwerking met E.S. Jordanova.

T-celfracties in 64 oogmelanomen

Als vervolg op eerder onderzoek [1] is in primair tumormateriaal van 64 oogmelanoompatiënten de T-celfractie bepaald. In eerdere analyses zijn op basis van genexpressie drie significant verschillende tumorklassen geïdentificeerd. Onze bepalingen van de T-celfracties laten zien dat één van deze klassen (Iib) gekenmerkt wordt door een uitgebreid T-celinfiltreet (**Figuur 6**).

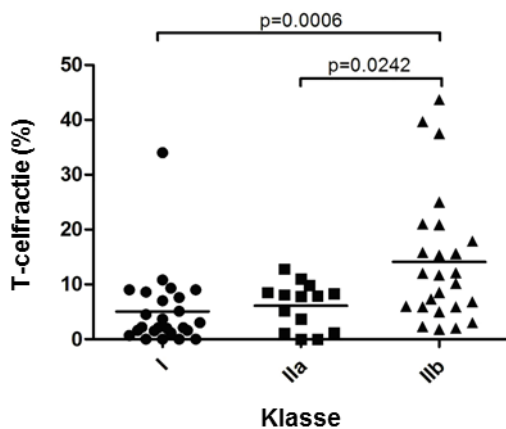
Opvallend genoeg, en in tegenstelling tot wat in veel andere vormen van kanker gevonden wordt, is dit T-celinfiltreet daarmee gekoppeld aan een ongunstige prognose voor de patiënt. Onderliggende mechanismen zijn daarom onderwerp van verdere analyse.



Figuur 5 - Twee coupekleuringen van ooglanelanoom-samples. In beide coupes zijn kankercellen **blauw** aangekleurd, T-cellen **groen** en macrofagen **rood**.

LINKS: ~39% van de cellen in deze coupe betreft daadwerkelijk een kankercel [1]. Onze methode schat de T-celfractie op ~42%. Beide waarden zijn in lijn met wat in deze coupe naar voren komt: er zijn ongeveer evenveel kankercellen als T-cellen aanwezig.

RECHTS: ~95% van de cellen in deze coupe betreft daadwerkelijk een kankercel [1]. Onze methode schat de T-celfractie op ~0%. Beide waarden zijn in lijn met wat in deze coupe naar voren komt: er zijn zeer veel kankercellen aanwezig en vrijwel geen T-cellen.



Figuur 6 - T-celfracties in 64 primaire ooglanelanomen, verdeeld in klassen.

CONCLUSIE

Met het kwantitatief beschrijven van een tumor wordt het mogelijk de aanwezigheid van verschillende celtypen te bestuderen.

Met dit onderzoek introduceren wij een nieuwe en unieke methode om op relatief eenvoudige wijze accuraat het T-celinfilttraat in kankersamples en andere typen weefsels te kwantificeren.

Deze methode kan op verschillende manieren bijdragen aan het onderzoek naar kanker. Zo hebben wij laten zien dat een moleculaire klasse van ooglanelanomen gekenmerkt wordt door een uitgebreid T-celinfilttraat.

Voordelen

Onze nieuwe methode om T-celinfilttraat te kwantificeren heeft enkele belangrijke voordelen:

- Waar andere technieken instabieler expressie-profielen of epigenetische markers gebruiken, is onze methode gebaseerd op een solide DNA-marker. Het is vrij uniek dat onderscheid op celtype gemaakt kan worden middels een dergelijke marker, omdat de meeste cellen in ons lichaam een identiek DNA-pakket bezitten.
- Een DNA-marker maakt het mogelijk om een grotere hoeveelheid weefsel door te meten. Waar coupekleuringen slechts een klein gedeelte van een tumor kunnen bevatten, kan met ddPCR de heterogene opbouw van tumoren beter benaderd worden.
- Onze methode maakt gebruik van digitale PCR, die op zichzelf enkele belangrijke voordelen kent ten opzichte van conventionele technieken. Zo kunnen resultaten gemakkelijker en eenduidiger worden geïnterpreteerd en is de nauwkeurigheid en sensitiviteit hoger dan bij real-time PCR. [3]

Belangrijk aandachtspunt

Bij onze methode is het van groot belang dat de stabiliteit van de gebruikte target ($\Delta 1$) en referentie is gewaarborgd. Hiermee wordt bedoeld dat het model zoals geschetst in **Figuur 2** ook daadwerkelijk in overeenstemming is met de werkelijkheid. Omdat in kankercellen vaak chromosomale afwijkingen worden gevonden (waarin delen van het DNA te veel of juist te weinig aanwezig kunnen zijn), kunnen deze kankercellen ons model verstoren. Het is van belang deze verstoringen op te sporen en hiervoor te corrigeren. [4]

ROL VAN DE STUDENT

Student heeft de experimenten gedaan en het wiskundige model gemaakt en in overleg met de begeleider verder uitgewerkt. De begeleider heeft het projectvoorstel en de assay aangedragen.

DANKWOORD

Ik wil graag Mark de Lange, Pieter van der Velden, Mieke Versluis, Wim Zoutman en Anton Langerak bedanken voor hun ondersteuning, discussie en kritische bijdrage aan dit project.

REFERENTIES

1. De Lange MJ et al. Heterogeneity revealed by integrated genomic analysis uncovers a molecular switch in malignant uveal melanoma. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):37824-35.
2. Dik WA et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med*, 2005. 201(11): p. 1715-23.
3. Hindson BJ et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83(22): 8604-8610.
4. De Lange MJ et al. Unpublished data.